

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01895

研究課題名(和文) コヒーレントラマン顕微鏡を用いた生理活性気体分子の生体内動態計測

研究課題名(英文) Monitoring physiologically active gaseous molecules in cells and tissues using coherent Raman microscopy

研究代表者

伊藤 輝将 (Ito, Terumasa)

東京農工大学・学内共同利用施設等・特任准教授

研究者番号：60783371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：匂い分子や吸入麻酔薬などの小さな生理活性気体分子の生体内動態は、直接観測が困難であるために詳細はほとんど知られていない。本研究課題では気体分子の濃度分布を高感度かつ非染色で測定するコヒーレントラマン顕微鏡を開発し、細胞や組織の内部における気体分子の輸送、局在や代謝を追跡できる新しい解析手法を確立する。本手法を用いることで組織中に数mM (=mmol/L) の濃度で存在する小分子を直接測定することが可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに提案された時間的に非対称な光パルスを用いた分子振動検出法は、超高速光学分野において全く新しい時間領域の光学設計に基づいており、それ自体に学術的価値がある。しかしそれ以上に、この手法によって生体組織中で検出できる分子濃度の限界を打破できたことは学術的にも実用的にも大きな価値がある。この新しい顕微鏡の解析手法は気体分子に限らず、多くの小分子薬剤、組織モデルに適用できるため、その恩恵は本研究課題でターゲットとした生命科学分野だけでなく、食品、化粧品、製薬分野などバイオメディカル分野に広く波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The kinetics of physiologically active small gaseous molecules such as odor molecules and inhalational anesthetics are poorly understood because direct microscopy observation of these molecules is difficult. In this research project, we develop a new coherent Raman microscopy that enables us to measure the spatial distribution of gaseous molecules with high sensitivity, without using labelling. We establish a new analytical method that can monitor the transport, localization and metabolism of gaseous molecules in cells and tissues. The new method can be used to directly measure small molecules in a tissue at a few millimolar (=mmol/L) concentration.

研究分野：生体医用光学、非線形光学、超高速光学

キーワード：誘導ラマン散乱顕微鏡 非染色イメージング 気体分子 小分子 位相変調

1. 研究開始当初の背景

本研究では、生体中に取り込まれた生理活性気体分子自体の動態を光学イメージングの手法を使って追跡する、という課題に挑戦する。陸上生物にとって重要な生理作用をもたらす匂い分子や、外科医療等に使用される吸入麻酔薬分子などをはじめ、揮発性の気体分子については神経科学分野で多くの知見が蓄積されてきた。その一方で、気体分子が気相から液相に輸送され、さらに液相から組織や細胞中に局在あるいは代謝されていく過程については、生理作用を理解する上で重要な知見であるにも関わらず、ミクロな光学イメージングで直接観測した研究例はほとんど見られない。気体分子の観測が困難である最大の理由は、分子サイズが小さいことである。特に生理活性を持つ分子の多くは分子量 300 以下の低分子化合物であり、一般的には蛍光分子などのラベルを付加すると本来の活性を示さなくなる。したがって、小さな分子の動態をリアルタイムに追跡する手段として非染色イメージングが必須となる。ラマン顕微鏡は生体計測に親和性の高い非染色の分子振動イメージングとして知られているが、原理的に微弱なラマン散乱光を検出するため測定感度が低いことが課題であった。

この問題はパルスレーザーを用いた非線形光学を用いて解決できる。超短パルスで分子振動を強制励起することでラマン散乱信号を増強するコヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) や誘導ラマン散乱 (SRS) 等のコヒーレントラマン顕微鏡は、生体内で小分子の動態をリアルタイムに捉えるという目的において最も強力なイメージング手法であると考えられている [1]。研究代表者と分担者らの研究グループは、簡易なレーザー光源構成で生体中の薬剤濃度分布計測を可能とした位相変調 CARS 顕微鏡を開発し、眼球角膜組織における薬剤浸透の *in vivo* 測定などのモデルケースでその有用性を実証してきた [2]。

従来のコヒーレントラマン顕微鏡の応用研究では、生体中に豊富に存在するタンパク質や脂質の C-H 結合による強いラマン散乱を利用した組織形態の高速撮影に注力したものが多い。その意味でのこの顕微鏡技術の感度限界、ショットノイズ限界については既に十分議論されている。しかし、気体分子が生体組織内に取り込まれるときの動態を追跡するには、組織自体の分子濃度よりも数桁低い濃度変化を検出する必要がある。数 mM 以下での薬剤検出になると、生体自体の強い背景ラマン散乱のゆらぎがむしろ仇となり、単純に長い時間をかけてショットノイズを減らせば検出できるという問題ではなくなる。現状、ラマンスペクトル全体を取得する分光イメージングであっても生体中での薬剤検出限界は数 10mM 程度である [3]。それ以下の濃度を計測するには、標的の振動モードが生体のラマンスペクトルと重ならないよう分子の一部を重水素等で置き換えるラベリングが必要であった [4]。また、従来の SRS 顕微鏡では試料に照射する 2 つの光パルス的一方を強度変調して、他方に現れる微弱な誘導ラマン散乱をロックイン検出で取得する。CARS 顕微鏡と比較すると、四光波混合による非ラマンの背景光を回避できることが大きな利点である。しかし、mM 付近の濃度の信号を撮像する場合、従来の SRS では振幅変調に付随する非線形効果による背景光を回避できないことが課題であった [5]。この問題を解決する手段として、研究代表者らは「位相変調 SRS 顕微鏡」を独自開発した [6]。この手法は従来の光強度変調に付随するアーティファクトも除去でき、さらに励起パルスと検出パルスを時間的に分離することにより生体由来のラマン背景光も回避できることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究課題では、非染色かつ高いコントラストで分子の局所濃度分布を撮影できるコヒーレントラマン顕微鏡を開発し、それを使って気体分子の細胞への輸送、細胞レベルおよび組織レベルの物質移動を直接追跡する分子動態解析モデルを確立することを目指した。この試みは、生命科学分野におけるミクロスケールの分子動態解析の新提案であるとともに、光科学の立場からは従来のコヒーレントラマン顕微鏡の検出濃度限界を破り、適用分野を拡張するための挑戦でもある。

3. 研究の方法

本研究課題では、光パルス整形技術を応用して位相変調 SRS 顕微鏡の信号コントラストを増強する新規検出技術 (非対称スペクトルフォーカス検出: 図 1 (a)) を開発し、それを用いて「細胞および生体組織中で mM オーダの薬剤信号」を見るという未踏領域への挑戦を試みる。

実際の顕微鏡測定においては、図 1 (b) のように気体分子が導入された透明培地を石英光学セル内に灌流させ、その状態で上から近赤外波長の光パルス (励起光パルスと 2 つのプロープ光パルス) を照射して透過した光を検出する。ここで集光点における SRS 効果を検出するため、2 つのプロープ光は励起光からわずかに遅延させて同時に照射し、そのうち 1 つのプロープ光に 100kHz の位相変調をかけておく。このとき透過したプロープ光のうち分子振動との相互作用によって強度変調に変換された成分をロックインアンプで検出することができる。この変調振幅は 2 つのプロープ光の差周波数と同じ振動周波数を持つ分子濃度に比例するため、レーザーを試料上で走査することで分子濃度分布の画像を得ることが可能となる。

本研究では主に脂溶性の気体分子に照準を絞り、匂い分子としてサリチル酸メチル、吸入麻酔薬としてセボフルランをモデル薬剤分子としてそれぞれ選定した。これらのモデル分子と培養

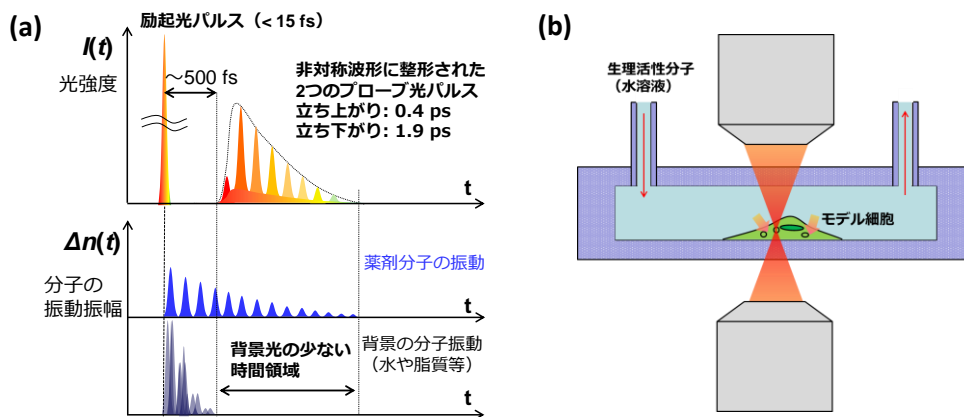


図 1 (a) 非対称スペクトルフォーカス検出法の動作原理、(b) 生理活性分子の顕微鏡測定系

細胞または組織を用いて、分子が細胞や組織の脂質成分に局在する様子を追跡することに注力した。さらに、将来の薬剤スクリーニング等への応用展開を目指して、三次元培養の組織モデルを用いて小分子が組織バリアを通過する様子を追跡する薬剤浸透のモデル実験系を開発した。

4. 研究成果

(1) 新規 SRS 検出法の開発

数 mM の分子濃度計測を実現するため、時間的に非対称に整形された 2 つのプロブ光パルスで誘導ラマン散乱を検出する新たな手法「非対称スペクトルフォーカス検出法」を開発した [7]。図 1 (a) のように励起パルスからわずかに時間遅延させた検出光パルスの時間波形の立ち上がりを鋭く、立ち下りを緩やかに整形することで、生体中の水や脂質、タンパク質などの振動緩和時間の短い分子によるラマン散乱を回避し、振動が長く持続する標的分子の振動モードの信号を選択的に強調することができる。この非対称波形は、プロブ光に対して強い線形チャープと非線形チャープを与える波形整形技術により実現した。図 2 (a) に新規開発した光学系を示す。技術のキーポイントはバンドパス光学フィルタの持つ高次分散特性を積極的に利用した点である。2 つのプロブ光をそれぞれバンドパスフィルタに通すことで、プロブ光の波長帯域が選択されると同時に、プロブ光には強い奇数次高次分散が加わり、分子振動を拾うために最適な非対称時間波形パルスを得ることができる。本手法を用いることで、各分子振動モードを分離できる波数分解能 (25 cm^{-1}) に保ちながら、従来は生体由来の不要なラマン散乱背景光に埋もれていた薬剤の空間分布を非染色かつ高いコントラストで撮像することが可能となった (図 2 (b))。

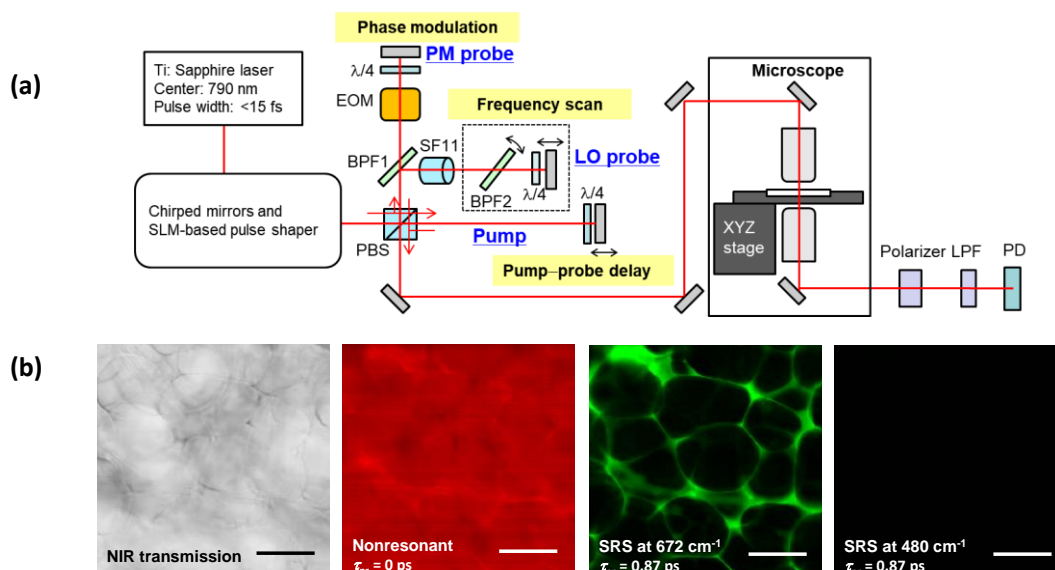


図 2 (a) 位相変調 SRS 顕微鏡の光学系 (SLM: 空間光変調器、EOM: 電気光学変調器、DM: ダイクロイックミラー、BPF1・BPF2: バンドパスフィルタ、SF11: 高分散ガラス、LPF: ロングパスフィルタ、 $\lambda/4$: $1/4$ 波長板、PD: 光検出器)、(b) 脂肪組織に浸透する小分子薬剤ジメチルスルホキシド (DMSO) の顕微鏡撮像例 (左から近赤外透過像、非共鳴背景光 (プロブ遅延 0ps)、振動ピーク波数の SRS 像、オフピーク波数の SRS 像)

(2) 匂い分子のイメージング

開発した新規 SRS 検出法による匂い分子イメージングの原理実証実験として、消炎鎮痛剤として知られる芳香族化合物のサリチル酸メチル (MS) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かしたものを脂肪組織に滴下し、PM-SRS 顕微鏡による撮像を行った。芳香族小分子のラマンスペクトルの多くは 700cm^{-1} から 900cm^{-1} の間に振動寿命の長い (狭帯域の) 特異的なスペクトルピークを持ち、生体組織中でも高いコントラストを得ることが可能である。図 3 に MS のラマンピーク (812cm^{-1})、および DMSO のラマンピーク (674cm^{-1}) に対応する位相変調 SRS 像とそれらの合成像を示す。この結果から、試料を滴下した後、脂溶性の MS 分子は脂肪組織に、水溶性の DMSO は細胞外にそれぞれ分配されることが確認された。

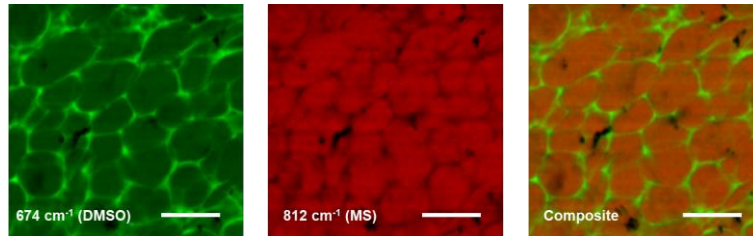


図 3 匂い分子の位相変調 SRS イメージング撮像例：(左) DMSO の SRS 像、(中央) サリチル酸メチル (MS) の SRS 像、(右) 両者を重ねた合成像

(3) 吸入麻酔薬の細胞への分子輸送

次に、吸入麻酔薬分子が細胞に輸送される様子を観察するためのモデル実験系の開発を行った。図 4 (a) は脂肪の主成分である脂肪酸 (オレイン酸) と吸入麻酔薬 (セボフルラン) の混合溶液 (濃度 920mM) を通常の従来の振幅変調 SRS と位相変調 SRS でラマンスペクトルをそれぞれ計測した結果を示している。通常の振幅変調 SRS では麻酔薬が大量に含まれていてもオレイン酸の背景信号成分が支配的になる。一方、位相変調 SRS ではセボフルランの最も特異性の高い長寿命振動ピーク (C-F 伸縮振動: 740cm^{-1}) が強調されており、高いコントラストの信号が観測できる。この波数において、セボフルランの信号とオレイン酸の背景ラマン散乱の比は 1000 以上であった。この比が 1 になるセボフルラン濃度は 0.75mM であることから、この測定系では数 mM オーダの定量測定が可能であると考えられる。図 4 (b) は吸入麻酔薬 (10mM セボフルラン) を溶かした培養液で脂肪細胞の周囲を満たし、その後の麻酔分子の輸送を観測した例である。吸入麻酔薬は脂溶性の低分子であるため、水溶性の培養液から脂肪細胞の中へ輸送され、脂肪滴内部に局在するようになる。平衡に達した時点での細胞内麻酔薬の信号を濃度換算すると約 150mM であり、麻酔薬が培養液 (水相) から脂肪滴 (油相) 内に移行すると一桁以上高い濃度に分配されることが示唆された。図 4 (c) は揮発性気体分子を封止しながら細胞内分子濃度を測定するためのモデル実験系である。灌流光学セル内に培養細胞を封止し、気化器で吸入

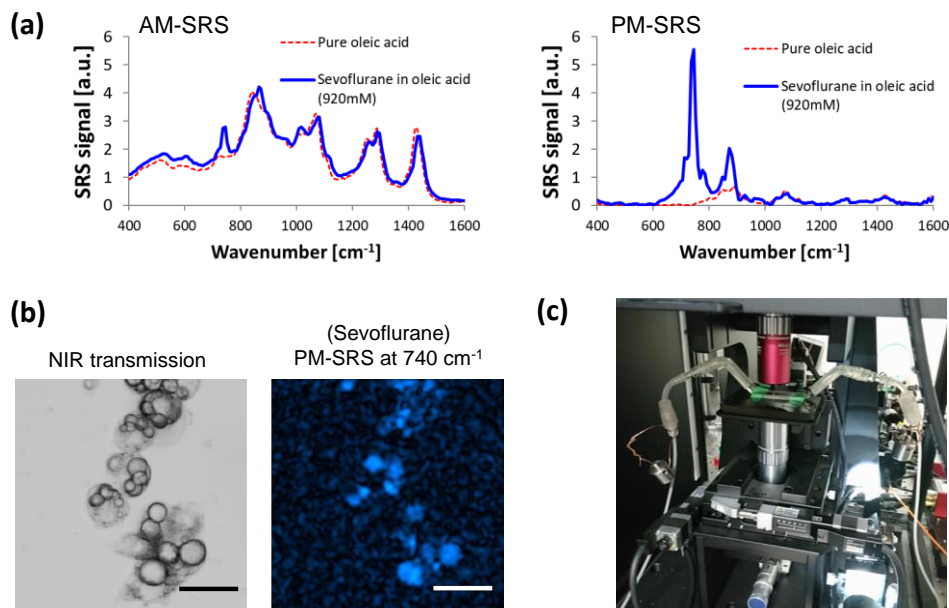


図 4 吸入麻酔薬 (セボフルラン) の非染色イメージングのモデル実験：(a) 従来の振幅変調 (AM-) SRS と位相変調 (PM-) SRS によるラマンスペクトル、(b) 脂肪細胞の透過像と位相変調 SRS 像 (スケールバー: $50\text{ }\mu\text{m}$) (c) 灌流光学セルを用いた顕微鏡測定系

麻酔薬を溶解させた液体培地を光学セルに送りながら SRS 顕微鏡による濃度測定を行うことができる。この実験系を用いて、気相から液相に溶けた麻酔薬分子が脂肪細胞へ輸送される様子をリアルタイム測定したところ、細胞内の麻酔薬濃度を誤差±1mM で定量できることが確認された。

(4) 組織モデルを用いた浸透評価

これまで開発した分子輸送モデル実験系をさらに広い応用分野に展開するため、組織モデルに対応した実験系の開発を行った。市販の三次元培養組織モデル (Epiderm, Mattek) を用いて、液体に溶けた分子が深さ方向に輸送される様子を SRS 顕微鏡で撮影し、液相から組織に至る深さ方向の濃度プロファイルを定量する測定系を確立した。原理実証実験では位相変調 SRS 顕微鏡を用いることで従来の振幅変調 SRS 顕微鏡に対して 20 倍以上高いコントラストで撮影できることが実証された (図 5) [8]。また、カフェイン、非ステロイド性抗炎症薬 (ロキソプロフェンナトリウム) 等の水溶性小分子の浸透実験では、組織内においても数 mM の濃度計測が可能であることが示された [9]。この結果は我々が知る限りにおいて、時間分解型のコヒーレントラマン分光・顕微鏡を実用濃度の薬剤イメージングに応用した世界初の例である。

以上から、本研究課題で新規開発した SRS 顕微鏡を用いることで、生理活性小分子が組織のバリアを通過する様子をリアルタイムに、かつ非染色で観察できることが実証された。本手法は培養細胞や皮膚組織バリアだけではなく、血液脳関門などの他の組織バリアや、呼吸器や腸管などの上皮細胞組織のモデルにも適用できる。したがって、本研究の成果は生理活性気体分子に関わる神経科学を中心とした学術分野への応用だけでなく、食品、化粧品、創薬分野における薬剤スクリーニング等の産業分野の応用にも広く貢献するものと考えられる。

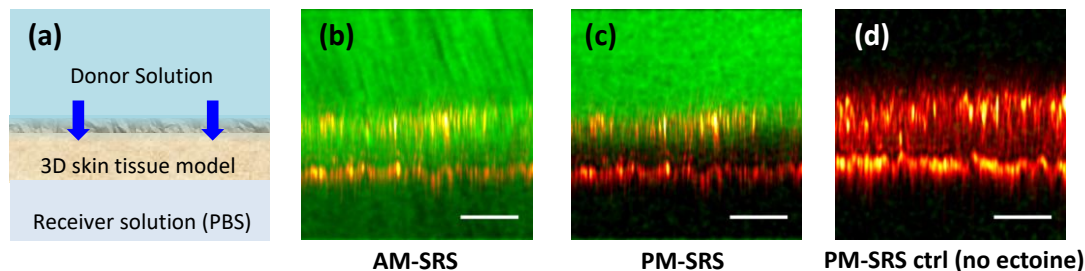


図 5 皮膚組織モデルを用いた薬剤浸透実験：(a) 模式図、(b) 振幅変調 SRS による断層イメージング、(c) 位相変調 SRS による断層イメージング、(d) ブランクテスト
green : 小分子薬剤 (エクトイン) の SRS 信号 : 848 cm^{-1} 、red hot : 光散乱による共焦点反射信号、スケールバー : $50\text{ }\mu\text{m}$

<引用文献>

- [1] J. X. Cheng and X. S. Xie, *Science* **350**, aaa8870 (2015)
- [2] M. Kawagishi et al., *Sci. Rep.* **5**, 13868 (2015)
- [3] C. H. Camp Jr and M. T. Cicerone, *Nat. Photon.* **9**, 295 (2015)
- [4] L. Wei et al. *PNAS* **110**, 11226 (2013)
- [5] D. Zhang et al. *Opt. Express* **21**, 13874 (2013)
- [6] T. Ito et al. *J. Opt. Soc. Am.* **34**, 1005 (2017)
- [7] T. Ito et al. *APL Photon.* **3**, 092405 (2018)
- [8] T. Ito et al. *CLEO Pacific Rim Conference 2020*, OSA Technical Digest, 12D-2 (2020)
- [9] T. Ito et al. *Proc. SPIE* **11656**, 116560G (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 伊藤輝将	4. 巻 49
2. 論文標題 パルス波形整形を用いた誘導ラマン散乱顕微鏡	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 66-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terumasa Ito, Yuki Obara, and Kazuhiko Misawa	4. 巻 3
2. 論文標題 Invited Article: Spectral focusing with asymmetric pulses for high-contrast pump-probe stimulated Raman scattering microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 APL Photonics	6. 最初と最後の頁 092405 ~ 092405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5030053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 伊藤輝将、三沢和彦	4. 巻 25
2. 論文標題 超短パルスレーザー照射で小分子の濃度分布を直接測定する顕微鏡を開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 レーザー加工学会誌	6. 最初と最後の頁 58 ~ 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terumasa Ito, Risa Iguchi, Fumiaki Matsuoka, Yoji Nishi, Tsuyoshi Ogihara and Kazuhiko Misawa	4. 巻 2020
2. 論文標題 High-contrast depth imaging of skin moisturizing agent using phase-modulated stimulated Raman scattering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CLEO PR 2020, OSA Technical Digest	6. 最初と最後の頁 C12D_2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/CLEOPR.2020.C12D_2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Terumasa Ito, Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Sumio Terada, Kazuhiko Misawa
2. 発表標題 Pump-probe stimulated Raman scattering microscopy for monitoring the transport of gaseous molecules
3. 学会等名 SPIE Photonics West BIOS 2019, San Francisco, USA; Proceedings Volume 10890, Label-free Biomedical Imaging and Sensing (LBIS) 2019; 108900S (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terumasa Ito, Kota Matsuura, and Kazuhiko Misawa
2. 発表標題 Nonlinear spectral focusing for high contrast pump-probe coherent Raman microscopy
3. 学会等名 XXI International Conference on Ultrafast Phenomena, Hamburg, Germany (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Terumasa Ito, Miyako Iritani, Fumiaki Matsuoka, and Kazuhiko Misawa
2. 発表標題 Time-resolved stimulated Raman scattering microscopy for robust quantitative chemical measurements in tissue
3. 学会等名 Photonics West BIOS 2021, Online, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine 2021, 116560G (5 March 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Terumasa Ito
2. 発表標題 Coherent Raman Scattering Microscopy: Ultrafast Optics for High-Contrast Drug Imaging
3. 学会等名 International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Terumasa Ito, Risa Iguchi, Fumiaki Matsuoka, Yoji Nishi, Tsuyoshi Ogihara and Kazuhiko Misawa
2. 発表標題 High-contrast depth imaging of skin moisturizing agent using phase-modulated stimulated Raman scattering
3. 学会等名 The 14th Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO PR 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 光検出装置、光検出方法	発明者 三沢和彦、伊藤輝将	権利者 東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、JP2020-002107	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 光検出装置、光検出方法	発明者 三沢和彦、伊藤輝将	権利者 東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、JP2020-035276	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Optical pulse pair generation device, light detection device, and light detection method	発明者 Kazuhiko Misawa and Terumasa Ito	権利者 Tokyo Univ. of Agric. and Tech.
産業財産権の種類、番号 特許、W02019220863A1	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 光パルス対生成装置、光検出装置、および光検出方法	発明者 三沢和彦、伊藤輝将	権利者 東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-093067	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Optical detection device and optical detection method	発明者 Kazuhiko Misawa and Terumasa Ito	権利者 Tokyo Univ. of Agric. and Tech.
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/007554	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 Optical detection device and optical detection method	発明者 Kazuhiko Misawa and Terumasa Ito	権利者 Tokyo Univ. of Agric. and Tech.
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/048526	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川岸 将彦 (Kawagishi Masahiko) (60323606)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	三沢 和彦 (Misawa Kazuhiko) (80251396)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関